第42卷 第2期
1999年5月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.42, No.2
May, 1999

杆状病毒凋亡抑制基因的稳定转化及抗凋亡昆虫细胞系的构建*

李小峰 齐义鹏** 朱 应 王业富

(武汉大学生命科学学院,武汉 430072)

摘要 构建了新霉素抗性基因为筛选标记的带有凋亡抑制基因p35的重组质粒p35IE1Neo,转化Sf9细胞后,经G418筛选得到含有p35IE1Neo的Sf9细胞,克隆化培养后命名为Sf9-35。PCR检测表明,Sf9-35细胞的染色体DNA上有p35基因的扩增带。经放线菌素D处理后的细胞核酸电泳和TdT介导bio-DUTP缺口末端标记(TUNEL)试剂盒检测,证实Sf9-35具有抗凋亡特性。

关键词 抗凋亡,昆虫细胞,p35基因

1991年R. J. Clem首次报道了苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, AcNPV)p35基因具有抗凋亡特性[1],之后昆虫杆状病毒中又有一些抗凋亡特性的基因被发现,如家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus, BmNPV)的p35基因[2],苹果小卷蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonolla* Granulosis Virus, CpGV)[3]和冷杉合毒蛾核多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* Nuclear Polyhedrosis Virus, Op-NPV)的iap基因[4]等等。进一步研究表明AcNPV的p35基因是极早期必需基因,但晚期也能表达,受宿主细胞因子反式调控[5,6],主要在感染早期起关键性的作用[5],表现在抑制ICE家族蛋白水解酶活性而抑制细胞凋亡[7]。它通过抑制病毒感染早期产生的细胞凋亡[1~4,8],调控病毒早期基因转录[9],而使病毒得以顺利复制。

目前为止,许多研究者认为凋亡抑制基因是杆状病毒宿主范围的重要决定因素之一[6,8,10]。如AcNPV的变种vAcAnh缺乏凋亡抑制基因p35,感染Sf21细胞后引起细胞凋亡,不能正常繁殖,子代病毒产量极低[1],但如果用含有抗凋亡的p35基因或CpGV的iap基因的转移载体与vAcAnh共转染Sf21细胞,抗凋亡的p35基因或iap基因在细胞内瞬时表达使细胞能够抗凋亡,使得vAcAnh正常繁殖产生子代病毒。因此也有人认为细胞凋亡是昆虫抵御病毒入侵的重要机制,而凋亡抑制基因则是病毒抵抗这种机制、使自身得以繁殖的有力武器。

由于p35和IE1是AcNPV的极早期基因,其启动子受Sf9细胞因子的反式调控,在Sf9细胞内不需任何病毒因子参与即可被启动,因此我们将IE1启动子控制的新霉素抗性基因(neo^r)作为筛选标记基因插入到含有p35基因的载体上,构建成转移载体,然后转化Sf9细

* 国家科委“九五”攻关项目
** 联系与负责作者
1997-08-04收稿,1998-06-02收修改稿

胞，使 p35 基因在细胞内能稳定表达，赋予细胞抗凋亡特性。这对今后研究 p35 基因的抗凋亡机制，昆虫杆状病毒在细胞内的复制及其宿主范围具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　质粒、细胞和试剂

质粒 pIE1Neo 系美国得克萨斯 A&M 大学 Jarvis 教授赠送，pUC35 为本室保存；Sf9 来自武汉大学保藏中心；TUNEL 检测试剂盒、PCR 扩增试剂盒和限制性内切酶购自华美生物工程公司；Grace 培养基、Lipofectin、胎牛血清和 G418 购自 Gibco 公司；放线菌素 D、核酸酶 A 和蛋白酶 K 购自 Promega 公司；PCR 扩增引物由中国科学院上海植物生理研究所合成。

1.2　转移载体 p35IE1Neo 的构建

以 *Sma* I 切下 pIE1Neo（系 IE1 基因启动子控制的新霉素抗性基因表达盒克隆在 pUC8 载体的 *Acc* I 位点）的 IE1neo 表达盒，克隆到质粒 pUC35（系 AcNPV 的 p35 基因克隆在 pUC8 载体的 *Eco*RI 位点）的 *Sma* I 位点（图 1）。然后以 *Eco*RI，*Sma* I 和 *Bam* HI 对其进行酶切鉴定，阳性重组质粒命名为 p35IE1Neo。

1.3　p35IE1Neo 在 Sf9 细胞内的稳定转化

1.3.1　p35IE1Neo 转化 Sf9 细胞：取 Lipofectin 20 μL，加入 10 μL 双蒸水，混匀后再加入 30 μL（5 μg）p35IE1Neo 质粒，37℃保温 15 min 后加入到 1 mL 不含血清和双抗的 Grace 培养液中，制成转染混合液，取一长满 Sf9 细胞的 10 mL 规格的细胞培养瓶，倒掉培养液，以 PBS 轻轻洗涤 3 次，加入上述转化混合液，28℃放置 8 h，然后倒掉转化混合液，加入 2 mL 生长液（含 10%胎牛血清及各100 μg/mL 青霉素、链霉素的 Grace 培养液），于 28℃培养 24 h。

1.3.2　含有 p35IE1Neo 的转化细胞筛选：取上述培养了 24 h的细胞加入 6 mL 新鲜生长液，轻轻吹打，制成细胞悬液，分装到两个 25 mL 的细胞培养瓶中，28℃培养 48 h，然后倒掉生长液，每瓶加入 4 mL 含有 1 mg/mL G418 的生长液，28℃培养 15 天后，倒掉含有 G418 的生长液，加入正常生长液，等细胞长满之后，以有限稀释法获得克隆化的细胞，即为转化细胞。

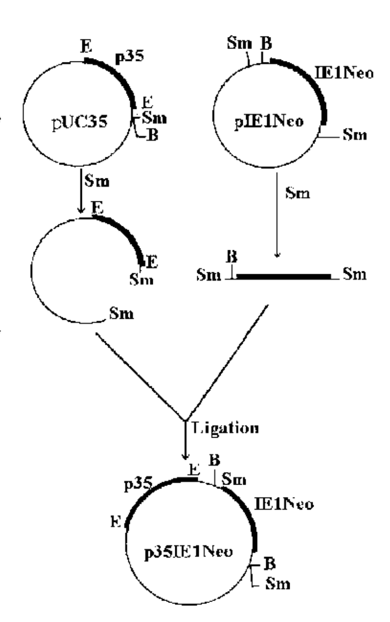


图 1　重组质粒 p35IE1Neo 的构建

Fig.1　Construction of recombinant plasmid p35IE1Neo

B：*Bam* HI；E：*Eco* RI；Sm：*Sam* I

1.4　转化细胞的 PCR 检测

1.4.1　细胞 DNA 的提取：将长成单层的转化细胞和 Sf9 细胞轻轻吹打成悬液，分别取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中，6 000 r/min离心 6 min，弃上清，加入 250 μL TE 悬浮沉淀，然后再加入 250 μL 裂解缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH8.0，0.4% SDS，5% 巯基乙醇，10 mmol/L EDTA），15 μL

50 μg/mL蛋白酶 K，3 μL RNAse A，于 37℃保温 2 h，然后酚/氯仿抽提 3 次，取上清加入 50 μL 3 mol/L NaAc 及 1 mL 无水乙醇沉淀核酸，12 000 r/min离心 10 min，倒掉上清，75%冰冻乙醇洗涤沉淀块 2 次，凉干后加入 50 μL TE，置 70℃水浴 6 h 使沉淀完全溶解。

1.4.2　引物设计：根据报道的 AcNPV p35 基因序列，以计算机辅助设计出扩增 p35 全基因的引物序列如下：

正向引物：5′-CCGAATTCAGTCCGATTTTCTCGACAACGA-3′；

反向引物：5′-CGTAGAATTCTACTCGTAAAGCCAGTTC-3′。

1.4.3　PCR 检测：PCR 扩增系统包括：50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl，pH9.0，0.1% Triton X-100，0.25 mmol/L dNTPs，1 μmol/L 引物，2 μL 细胞 DNA，2.5u Taq 酶，总体积 50 μL。扩增条件为：93℃ 60 s，50℃ 60 s，72℃ 120 s，共 30 次循环。扩增产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5　细胞抗凋亡特性测定

1.5.1　放线菌素 D 处理后的 DNA Ladder 检测：取长成致密单层的转化细胞和 Sf9 细胞，倒掉生长液，加入含有 70 ng/mL 放线菌素 D 的生长液，28℃培养 72 h 后显微镜观察，然后轻轻吹打细胞，将细胞悬起，取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中，16 000 r/min离心 20 min，以上述方法提取核酸，1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2　放线菌素 D 处理后的细胞凋亡检测：按照华美生物工程公司生产的 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作，即 70 ng/mL 放线菌素 D 处理转化细胞和 Sf9 细胞 72 h 并制成悬液滴在玻片上，晾干。10% 的甲醛固定后以蛋白酶 K 适度消化，然后以 Biotin-11-dUTP 对细胞内 DNA 末端进行标记，再加入 Avidin-HP 与之结合，由 DAB 显色。凋亡细胞因核酸断裂末端较多而呈棕色。

2　结果与讨论

2.1　重组质粒的鉴定

重组质粒的构建过程见图 1，构建成功的 p35IE1Neo 经 *Bam*HI，*Eco*RI 和 *Sma*I 酶切，电泳结果见图 2。

从图 2 可看出 p35IE1Neo 经 *Bma*HI 酶切（A）释放一条 1.6 kb 的片段，经 *Eco*RI 酶切（B）释放一条 1.4 kb 片段，经 *Sma*I 酶切（C）释放一条 1.6 kb 的片段，与预期的结果一致（参考图 1），表明载体构建正确。

2.2　转化细胞的鉴定

p35IE1Neo 质粒转化 Sf9 细胞后，经 2 周的 G418 压力筛选，正常的 Sf9 细胞被杀死，只有含 p35IE1Neo 质粒 DNA 的细胞才能存活。由于 p35IE1Neo 质粒无真核复制子，只有整合到细胞染色体上以后，才能随同真核细胞染色体一起复制，因此，可初步认为 p35IE1Neo 已整合到 Sf9 细胞的染色体上，所获细胞为转化细胞，经过 2 周的克隆化培养获得转化细胞纯系，命名为 Sf9-35。在培养 20 代后对 Sf9-35 细胞 DNA 进行 PCR 检测。由图 3 可以看出，Sf9 基因组 DNA 经 PCR 检测没有出现预期的带。而转化细胞基因组 DNA 的 PCR 扩增，出现了预期的一

条 1.4 kb 的带。证明转化细胞中含有 p35 基因，即 p35IE1Neo 质粒 DNA 已整合到 Sf9 细胞的染色体上。

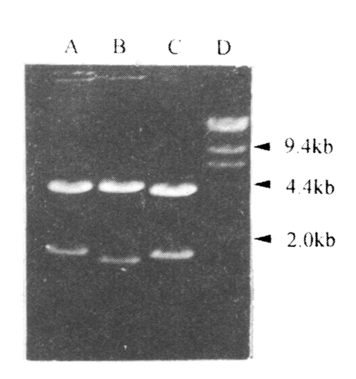


图 2　重组质粒 p35IE1Neo 酶切分析结果

Fig.2　Restriction enzyme analysis of p35IE1Neo

A：p35IE1Neo/*Bam*HI；B：p35IE1Neo/*Eco*RI；

C：p35IE1Neo/*Sma*I；D：λ DNA/*Hin*dIII

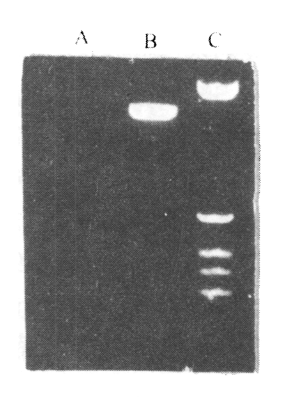


图 3　PCR 检测结果

Fig.3　Results of PCR

A：Sf9；B：Sf9-35；

C：pBR322 DNA/*Hin*fI

2.3　转化细胞 Sf9-35 抗凋亡特性测定

研究表明[11]放线菌素 D 能引起细胞凋亡，因此我们选用放线菌素 D 处理细胞，诱发细胞凋亡。由图 4：A 可以看出，在 70 ng/mL 放线菌素 D 存在时，Sf9 细胞大量碎化呈明显凋亡

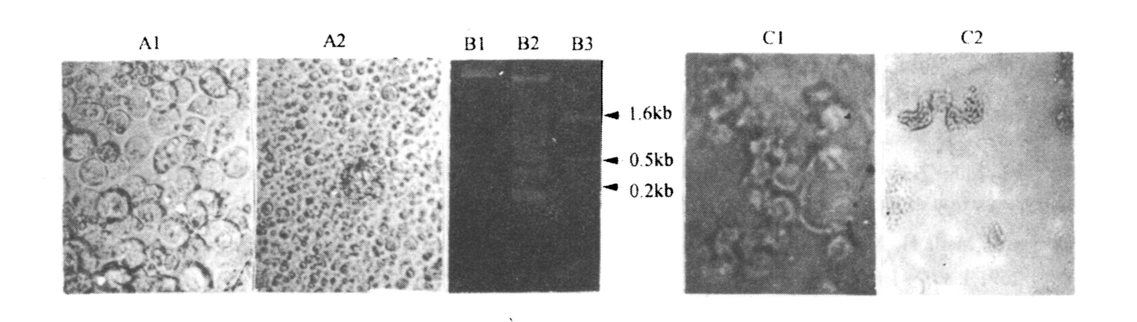


图 4　70 ng/mL 放线菌素 D 处理 3 天后 Sf9-35 和 Sf9 细胞的形态（A），DNA 电泳（B）及 TUNEL 检测（C）结果

Fig.4　Morphology (A), DNA electrophoresis (B) and TUNEL detection (C) of Sf9-35 and Sf9 cells after 3 days 70 ng/mL actinomycin D-treatment

A1：Sf9 cells；A2：Sf9-35 cells；

B1：DNA of Sf9-35；B2：DNA of Sf9；B3：pBR322 DNA/*Hin*fI；

C1：Sf9-35 cells；C2：Sf9 cells

状（A2），而 Sf9-35 仅有少量细胞凋亡（A1）。p35 基因受宿主细胞因子反式调控，能够直接在 Sf9 细胞内表达，Pamela 曾报道[6]，微量的 p35 蛋白在细胞内就能使细胞抗凋亡，与我们的

结果一致。

细胞凋亡的另一个特征是基因组 DNA 被有规律地切割成 200bp 左右或其倍数的片段，琼脂糖凝胶电泳表现为“Ladder”状条带[6,8,10]。由图 4：B 可以看出，经 70 ng/mL 放线菌素 D 处理 72 h 的 Sf9-35 细胞（B1）基因组 DNA 在琼脂糖凝胶电泳时没有看到典型的 DNA “Ladder”形状，而 Sf9 细胞（B2）则出现典型的 DNA “Ladder”，表明 Sf9-35 细胞具有抗凋亡特性。由于细胞凋亡时，基因组 DNA 被切割，产生大量末端，因此我们使用 TUNEL 凋亡细胞检测试剂盒，对细胞内的 DNA 末端进行标记，然后显色，如果细胞凋亡，则由于细胞内 DNA 末端较多而能够被标记而显色，非凋亡的细胞内 DNA 末端较少，被标记的 DNA 很少，因而不能显色。由图 4：C 可以看到 Sf9-35 细胞经 70 ng/mL 放线菌素 D 处理 72 h 后检测，细胞没有着色（C1），表明细胞没有凋亡；而 Sf9 细胞则呈棕色（C2），表明细胞凋亡。由此可进一步断定 Sf9-35 细胞具有抗凋亡之特性。

下一步我们将研究各种杆状病毒在 Sf9-35 细胞上的感染状况，以确定 p35 基因对病毒复制的影响，进一步揭示昆虫杆状病毒复制的机理。

参 考 文 献 （References）

1 Clem R J，Marcus F，Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells，Science，1991，254：1 388～1 390

2 Shizuo G K，Majimak and Maedas. Identification and characterization of p35 gene of *Bomyx mori* nuclear polyhedrsis virus can prevents virus-induced apoptosis，J. Virol.，1993，67（1）：455～463

3 Norman E C，Clem R J，Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif，J. Virol.，1993，67（4）：2 168～2 174

4 Bimbaum M J. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypetide with Cys/His sequence motifs，J. Virol.，1994，68：2 521～2 528

5 Pamela A H，Donglas J L. The apoptotic suppressor p35 is required early during baculovirus replication and is to the cytosol of infected cells，J. Virol.，1994，68（6）：3 467～3 477

6 Clem R J，Miller L K. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and *in vivo* infectivity of a baculovirus，J. Virol.，1993，67（7）：3 730～3 738

7 Nancy J B，Maria H，Margaret H *et al*. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35，Science，1995，269：1 885～1 888

8 Palli S R，Caputo G F，Sohi S S *et al*. CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line，Virol.，1996，222：201～213

9 Gong M，Guarino L A. Expression of the 39k promotor of AcNPV is increased by the apoptotic suppressor p35，Virol.，1994，204：38～44

10 Nor Chejanovsky，Eduard Gershburg. The wild-type AcNPV induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells，Virol.，1995，209：519～525

11 Cartier J L，HereshBerger P A，Friesen P D. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35：Dominant interference by N-terminal sequences p35. J. Virol.，1994，68（12）：7 728～7 737

STABLE TRANSFORMATION WITH ANTI-APOPTOTIC GENE OF BACULOVIRUS AND CONSTRUCTION OF ANTI-APOPTOTIC INSECT CELL LINE

Li Xiaofeng　　Qi Yipeng*　　Zhu Ying　　Wang Yefu

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan　430072)

Abstract　A transfer vector p35IE1Neo containing anti-apoptotic p35 gene and neomycin-resistant gene (as selection marker) was constructed. After transfecting Sf9 cells and G418 screening, cells transformed with p35IE1Neo were obtained. One clone was picked and named Sf9-35. By PCR detection, it was found that the genome of Sf9-35 cells contain p35 gene. After actinomycin D treatment and cellular DNA electrophoresis and detection of TUNEL (TdT mediated bio-dUTP nick endlabeling), Sf9-35 cells were found to be resistant to apoptosis induced by actinomycin D.

Key words　anti-apoptosis, insect cells, p35 gene

* Corresponding author